

論文内容の要旨

論文提出者氏名 塩見 聡史

論文題目: IL-17 is involved in *Helicobacter pylori* - induced gastric inflammatory responses in a mouse model

(ヘリコバクター・ピロリ誘発マウス胃炎モデルにおける IL-17 の関与)

論文内容の要旨

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は胃十二指腸疾患の発症に関与していることが知られており、その病態形成には Th1 サイトカインが重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、近年発見された炎症性サイトカインである IL-17 については不明な点が多い。そこで、*H. pylori* 感染症における IL-17 の役割を明らかにするため、IL-17 遺伝子欠損 (IL-17^{-/-}) マウスを用い、*H. pylori* 菌株をマウスに感染させ、感染防御ならびに病態形成における IL-17 の関与を検討した。

マウスは、6 週齢の野生型 C57BL/6 マウス、IL-17^{-/-}マウスを用いた。*H. pylori* 菌株として cagA および vacA 遺伝子陽性である CPY2052 株を用いた。CPY2052 株は、ヘリコバクター用 Anaeropack System (80% N₂、15% CO₂、5% O₂) を用い、*H. pylori* 選択培地 (栄研化学) 上で 37 °C、5 日間培養した。コロニーをさらに brain-heart infusion (BHI) 液体培地 (15%FBS とグリセリン含有) で培養後、2 X 10⁸ CFU/ml に調製した 0.2ml の *H. pylori* 菌液を、あらかじめ 4 時間絶食させたマウスに胃ゾンデを用いて経口感染させた。感染 1、2、3、4、6、12 ヶ月後にマウスを安楽死させ、胃を摘出した。摘出した胃を長軸にそって二分割し、一方を胃内定着菌数 (胃内コロニー数) の測定に、他方は病理組織学的評価 (炎症の程度) に用いた。

胃内コロニー数は、胃の半分を phosphate-buffered saline (PBS) 1 ml にて homogenize し、100 μl を HSBHI 寒天培地上で、Anaeropack System を用い 37 °C、5 日間培養し、形成されたコロニーを計測した。なお、コロニーが目的のコロニーであるかどうかは以下の特異的 primer を用いた PCR 法にて確認した。

他方の検体は、10%ホルマリンで固定、パラフィンで包埋後、5μm で薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。炎症の程度は、鏡検にてシドニーシステムに従いスコア化を行い、評価を加えた。

1) *H. pylori* 感染後の正常マウスおよび IL-17^{-/-}マウスにおける胃内菌数を比較検討した。その結果、正常マウス胃内菌数は感染 6 ヶ月後まで増加したが、IL-17^{-/-}マウス胃内菌数は有意に少なかった。

2) 感染 2 ヶ月後の正常マウスでは、固有層と粘膜下組織に中等度の細胞浸潤および粘膜上皮に軽度の糜爛を認めた。感染 6 ヶ月後には、粘膜上皮の糜爛は著しくなり、固有層と粘膜下組織において中等度の細胞浸潤が認められた。しかしながら、IL-17^{-/-}マウスにおいてはほとんど炎症所見を認めなかった。

3) 胃粘膜を体部と幽門部に、浸潤細胞を好中球と単核細胞に分類し、正常マウスおよび IL-17^{-/-}マウスにおける細胞浸潤の程度を比較検討した。その結果、好中球浸潤は幽門部に比べ体部でその程度は高く、正常マウスでは感染 1 ヶ月後より好中球浸潤が認められたのに対し、IL-17^{-/-}マウスにおいて好中球浸潤は有意に抑制されていた。一方、単核細胞浸潤については、体部と幽門部における差はほとんど見られず、正常マウスおよび IL-17^{-/-}マウスにおける細胞浸潤の程度にも有意差は認められなかった。

4) 胃粘膜中の好中球の減少を客観的に評価するため、*H. pylori* 感染 IL-17^{-/-}マウス胃粘膜における MPO 活性を ELISA で測定した。その結果、正常マウスに *H. pylori* を感染させると、胃粘膜中には有意に高い MPO 活性が認められたが、*H. pylori* 感染 IL-17^{-/-}マウスにおいては有意に MPO 活性が低下していた。

5) *H. pylori* 感染により胃粘膜において IL-17 が産生されるかどうかを検討するため、組織中の IL-17 濃度を ELISA 法で測定した。その結果、感染 2 ヶ月後より胃粘膜において IL-17 が検出されはじめ、感染 12 ヶ月後まで有意な IL-17 産生が認められた。

Hp 感染により胃炎が誘発されることは良く知られた事実であるが、胃潰瘍あるいは胃癌に至る症例は *H. pylori* 感染患者の一部である。これらの病原性の違いは、病原体側の因子および宿主側の因子によるものと考えられている。病原体側のビルレンス因子として、菌の運動性、ウレアーゼ産生性、カタラーゼ産生性、ホスホリパーゼ C 産生性、胃粘膜上皮への付着性、空胞化毒素 A (Vac A) 産生性、および cagA (サイトトキシン関連遺伝子) などの病原遺伝子群の存在などがあげられる。一方、宿主側の因子として病原体に対する個々の免疫反応の遺伝子学的差異、例えば、IL-1 遺伝子の polymorphism が胃癌などの発症率と関連しているとの報告などがある。

宿主側の免疫反応として、*H. pylori* 感染により IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-17、IL-18、TNF-α、IFN-γ などのサイトカインが胃粘膜局所で産生されることが知られており、胃炎などの病態形成は IFN-γ などの Th1 サイトカインが重要であるとされている。しかしながら、Th1 サイトカインや Th2 サイトカインとは異なる IL-17 については慢性関節炎などの炎症性疾患において重要な役割を果たしていることは知られているが、*H. pylori* 感染症における役割は不明であった。そこで、われわれは IL-17 遺伝子が欠損している IL-17^{-/-}マウスにおいては、*H. pylori* 感染による胃炎の発症が軽減するのではないかと仮定し、IL-17^{-/-}マウスと正常マウスを用いて *H. pylori* 感染実験を試みた。その結果、予想通り、IL-17^{-/-}マウスにおいては、*H. pylori* 感染 6 ヶ月後でも胃粘膜にほとんど炎症病変が認められなかった。また、炎症浸潤細胞の中でも好中球浸潤だけが有意に抑制されていたことより、IL-17 の欠損により好中球の浸潤が抑制された結果、炎症反応が抑制されていると考えられた。

これらの結果より、従来知られていた Th1 サイトカインに加え、新規に発見された IL-17 も胃炎の発症に重要な役割を果たしていると考えられた。